

Deutsches Patent- und Markenamt

München, den 04.09.2002
 Ferndurchwahl: (089)2195-2482

Deutsches Patent- und Markenamt · 80297 München

Aktenzeichen: 695 28 070.8-08
 Ihr Zeichen: 4321.205-EP,PeV
 Anmeldernr.: 11949503
 Novozymes A/S

Reference		Country	
Novozymes A/S Krogshoejvej 36			
Agent S/K 19. SEP. 2002		Short title MSH	
Action		Term	
Betr.: Europäisches Patent mit der		Veröffentlichungsnummer	
		SLK 19. SEP 2002	
0784674			

Das Europäische Patentamt hat auf die europäische Patentanmeldung 95 93 4621.4 ein Patent mit der im Betreff genannten Veröffentlichungsnummer erteilt.

Das Patent, dessen Wirkung für die Bundesrepublik Deutschland nach Art. 79 Abs. 3 und 97 Abs. 4 EPÜ mit der Veröffentlichung des Hinweises auf die Patenterteilung im Europäischen Patentblatt eintritt, wird beim Deutschen Patent- und Markenamt unter dem Aktenzeichen

695 28 070.8-08

geführt. Es wird gebeten, im Schriftverkehr mit dem Deutschen Patent- und Markenamt und bei Einzahlungen nur noch dieses Aktenzeichen zu verwenden.

Falls die gesamte europäische Patentschrift nicht in deutscher Sprache veröffentlicht worden ist, hat der Patentinhaber innerhalb einer Frist von drei Monaten eine deutsche Übersetzung dieser Patentschrift (zweifach) beim Deutschen Patent- und Markenamt einzureichen und die Gebühr für deren Veröffentlichung zu entrichten. Als Verwendungszweck ist neben dem amtlichen Aktenzeichen der Gebührencode 313 820 anzugeben. Hinsichtlich der Zahlungsmöglichkeiten wird auf die Rückseite verwiesen. Die Frist beginnt mit der Veröffentlichung des Hinweises auf die Patenterteilung im europäischen Patentblatt. Wird innerhalb der Frist die Übersetzung nicht eingereicht oder die Gebühr nicht entrichtet, so gelten die Wirkungen des europäischen Patents für die Bundesrepublik Deutschland als von Anfang an nicht eingetreten. Als nächste Jahresgebühr wird die 08. Jahresgebühr fällig. Sie ist an die Zahlstelle des Deutschen Patent- und Markenamtes einzuzahlen und kann bis zum 31.12.2002 zuschlagfrei entrichtet werden.

Zusatz für Vertreter: Weitere Zustellungen erfolgen nur nach Vorlage einer Vollmacht bzw. Anzeige der Vertretungsübernahme.

Diese Mitteilung wurde maschinell erstellt und wird nicht unterschrieben.

Patentabteilung 11
 EP-Geschäftsstelle

BEST AVAILABLE COPY

Bitte Anmelder/Inhaber + Aktenzeichen bei allen Eingaben angeben; bei Zahlungen auch Verwendungszweck. Hinweise auf der Rückseite beachten!

Annahmestelle und Nachtbriefkasten nur Zweibrückenstr. 12	Dienstgebäude Zweibrückenstr. 12 (Hauptgebäude)	Heusadresse (für Fracht) Deutsches Patent- und Markenamt Zweibrückenstr. 12 80331 München	Telefon (089) 2195-0 Telefax (089) 2195-2221 Internet: http://www.dpma.de	Bankverbindung 88k München 700 010 54 (BLZ 700 000 00)
--	--	--	--	--



PATENT- OG VAREMÆRKESTYRELSEN

Reference		Country	
Agent SLK		Short title 06. NOV 2002	
Action		Term -	

Novozymes A/S
Krogshøjvej 36
2880 Bagsværd

Helgeshøj Allé 81
2630 Taastrup
Tlf 43 50 80 00
Fax 43 50 80 01
CVR-nr 17 03 94 15
pvs@dkpto.dk
www.dkpto.dk

ØKONOMI- OG
ERHVERVS MINISTERIET

noteret
Jeto 02.11.06

Vor ref: 0784674
Deres ref: 4321.205-DK

Dato: 4. november 2002

SLK 06. NOV 2002

06. NOV 2002

MSH

Novozymes A/S

Vedr.: DK/EP patent nr. 0784674. Virkning for Danmark.

Hermed har ovennævnte europæiske patent fået virkning for Danmark, og er indført i patentregistret under registreringsnummer DK/EP 0784674. Patentbrev er vedlagt.

De kan opretholde patentet, så længe De betaler årsgebyrer, dog højst i 20 år regnet fra den dag, patentansøgningen anses for indleveret.

Årsgebyrer for gebyrår, som begynder efter den dag, hvor Den Europæiske Patentmyndighed har bekendtgjort sin afgørelse om meddelelse af patentet, skal betales til Patent- og Varemærkestyrelsen.

Ved henvendelse til Patent- og Varemærkestyrelsen kan De få oplysning om de nuværende årsgebyrers størrelse.

De har selv ansvaret for betaling af årsgebyrer. Hvis De ikke betaler årsgebyrerne rettidigt, bortfalder patentet, uanset om der er modtaget påmindelse om betaling eller ej.

Gebyrerne kan betales ved check trukket i et dansk pengeinstitut, via postgiro eller ved personlig henvendelse til direktoratets kasse. Gebyrerne skal betales i danske kroner. Husk venligst at oplyse patentets nummer, når De betaler gebyrerne.

Med venlig hilsen

Jette Pawelczuk
Afdelingsleder

L.C. JETO ✓

NZAS-0020584



Kongeriget Danmark

Patent nr. DK/EP 0784674

Det europæiske patent på den opfindelse, som er angivet i vedlagte oversættelse af europæisk patentskrift, har fået virkning for Danmark. På patentskriftets forside findes oplysning om patenthaver, om dagen for Den Europæiske Patentmyndigheds bekendtgørelse af patentets meddelelse, om dagen for bekendtgørelse af dansk oversættelse af patentskriftet og om den europæiske indleveringsdag, som er dagen, fra hvilken patenttiden løber.

Patentets virkning for Danmark er meddelt i medfør af patentloven, jf. lovbekendtgørelse nr. 587 af 2. juli 1993.

4. november 2002

Patent- og Varemærkestyrelsen
Økonomi- og Erhvervsministeriet

Mogens Kring
Direktør



PATENT- OG VAREMÆRKESTYRELSEN

NZAS-0020585



Patent- og
Varemærkestyrelsen

(12) Oversættelse af
europæisk patentskrift

-
- (51) Int.Cl⁹: C 12 N 9/20 C 12 N 1/14
(45) Oversættelsen bekendtgjort den: 2002-11-04
(80) Dato for Den Europæiske Patentmyndigheds bekendtgørelse om meddelelse af patentet: 2002-09-04
(86) Europæisk ansøgning nr.: 95934621.4
(86) Europæisk indleveringsdag: 1995-10-26
(87) Den europæiske ansøgnings publiceringsdag: 1997-07-23
(86) International ansøgning nr.: PCT/DK95/00425
(87) Internationalt publikationsnr.: WO/9613579
(30) Prioritet: 1994-10-26 DK 1235/94
(84) Designerede stater: AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU NL PT SE
- (73) Patenthaver: Novozymes A/S, Krogshøjvej 36, 2880 Bagsværd, Danmark
(72) Opfinder: OXENBOLL, Karen M., Novo Nordisk A/S-Novo Allé, 2880 Bagsværd, Danmark
BORCH, Kim, Novo Nordisk A/S-Novo Allé, 2880 Bagsværd, Danmark
PATKAR, Shamkant Anant, Novo Nordisk A/S-Novo Allé, 2880 Bagsværd, Danmark
-

(54) Benævnelse: Hidtil ukendt lipolytisk enzym

- (56) Fremdragne publikationer:
EP-A- 0 130 064
WO-A-94/03578
US-A- 5 439 811
DIALOG INFORMATION SERVICES, File 155, Medline, Dialog Accession No. 09225262, Medline Accession No. 95155262, NAGAO T. et al., "Cloning and Nucleotide Sequence of cDNA Encoding a Lipase from *Fusarium Heterosporum*"; & J. BIOCHEM., (TOKYO) (JAPAN), Sep. 1994, 116(3), p536-40.
DIALOG INFORMATION SERVICES, File 5, BIOSIS, Dialog Accession No. 4087161, Biosis Accession No. 76037012, GUMENOV V.L. et al., "The Content of Cyclic Nucleotides and Phospho di Esterase Activity in the Ontogenesis of the Phyto Pathogenic Fungus *Fusariumculmorum*"; & PRIKL. BOKHIM. MIKROBIOL., 18(5), 1982, 652-658.
DIALOG INFORMATION SERVICES, File 5, BIOSIS, Dialog Accession No. 3130931, Biosis No. 70080838, LINT.S. et al., "Isolation and Characterization of a Cuticular Poly Ester Cutin Hydrolyzing Enzyme from Phytopathogenic Fungi"; & PHYSIOL. PLANT. PATHOL., 17(1), 1980, 1-16.
DIALOG INFORMATION SERVICES, File 155, Medline, Dialog Accession No. 03118570, Medline Accession No. 77020570, SOLIDAY C.L. et al., "Isolation and Characterization of a Cutinase from *Fusarium Roseum Culmorum* and Its Immunological Comparison With Cutinases from *F. Solani Pisi*"; & ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS., (UNITED STATES), Sep. 1976, 176(1), p334-43.

Teknisk område

Den foreliggende opfindelse angår hidtil ukendte lipolytiske enzymer. Mere specifikt tilvejebringer opfindelsen hidtil ukendte lipolytiske enzymer afledt ud fra *Fusarium culmorum*.

Baggrundsteknik

Lipolytiske enzymer finder mangfoldige industrielle anvendelser. Alkalisk lipase er af særlig interesse til anvendelse i detergentsammensætninger.

Alkaliske lipaser af mikrobiel oprindelse er blevet beskrevet, hvilket indbefatter lipaser opnået ud fra *Fusarium*. Lipaser opnået ud fra *Fusarium culmorum* er aldrig blevet beskrevet.

Sammendrag af opfindelsen

Det er et formål ifølge den foreliggende opfindelse at tilvejebringe hidtil ukendte alkaliske lipolytiske enzymer (EC 3.1.1.3).

Opfindelsen tilvejebringer i sit første aspekt følgelig et lipolytisk enzym afledt ud fra *Fusarium culmorum*.

Enzymet har et pH-optimum i området fra ca. 7 til ca. pH 9, mere specifikt ca. pH 8, når det bestemmes ved 30 °C med tributyrin som substrat.

Enzymet har følgende N-terminalaminosyresekvens (jf. SEQ ID NO:1):

Ala-Val-Ser-Val-Ser-Thr-Thr-Asp-Phe-Gly-Asn-Phe-Lys-Phe-Tyr-Ile-Gln-His-Gly-Ala-Ala-Ala-Tyr-Xaa-Asn-

Opfindelsen tilvejebringer i sit andet aspekt en fremgangsmåde til fremstilling af det lipolytiske enzym, hvilken fremgangsmåde omfatter dyrkning af en lipase-producerende stamme af *Fusarium culmorum* i et egnet næringsmedium, der indeholder carbon- og nitrogenkilder og andre uorganiske salte, efterfulgt af indvinding af det lipolytiske enzym.

Opfindelsen tilvejebringer i sit tredje aspekt en fremgangsmåde til fremstilling af det lipolytiske enzym, hvilken fremgangsmåde omfatter at isolere et DNA-fragment, der indkoder det lipolytiske enzym; kombinere DNA-fragmentet med et passende ekspressionssignal i en passende plasmidvektor; introducere plasmidvektoren i en passende vært enten som et autonomt replikerende plasmid eller integreret i kromosomet; dyrke værtsorganismen under betingelser, der fører til ekspression af det lipolytiske enzym; og indvinde enzymet ud fra dyrkningsmediet.

Opfindelsen tilvejebringer i yderligere aspekter detergentsammensætninger, såvel som detergentadditiver, der omfatter det lipolytiske enzym ifølge opfindelsen.

Opfindelsen tilvejebringer endelig en biologisk ren kultur af stammen *Fusarium culmorum* CBS 513.94.

Detaljeret beskrivelse af opfindelsen

Mikroorganismen

Opfindelsen tilvejebringer lipolytiske enzymer afledt ud fra en stamme af svampen *Fusarium culmorum*. *Fusarium culmorum* er en kendt art, og stammer af *Fusarium culmorum* er blevet deponeret og er offentligt tilgængelige fra depositar-institutter, for eksempel Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Tyskland og American Type Culture Collection (ATCC), USA.

I en foretrukken udførelsesform tilvejebringer opfindelsen et lipolytisk enzym afledt ud fra stammen *Fusarium culmorum* DSM 1094, *Fusarium culmorum* DSM *Fusarium culmorum* 62 184, *Fusarium culmorum* DSM 62 188, *Fusarium culmorum* DSM 62 191, *Fusarium culmorum* DSM 62 223, *Fusarium culmorum* ATCC 12 656, *Fusarium culmorum* ATCC 15 620, *Fusarium culmorum* ATCC 16 430, *Fusarium culmorum* ATCC 16 551, *Fusarium culmorum* ATCC 26 556, *Fusarium culmorum* ATCC 34 910, *Fusarium culmorum* ATCC 34 913, *Fusarium culmorum* ATCC 36 017, *Fusarium culmorum* ATCC 36 879, *Fusarium culmorum* ATCC 36 881, *Fusarium culmorum* ATCC 36 886, *Fusarium culmorum* ATCC 44 417, *Fusarium culmorum* ATCC 46 040.

Fusarium culmorum ATCC 56 088, *Fusarium culmorum* ATCC 56 089, *Fusarium culmorum* ATCC 60 275, *Fusarium culmorum* ATCC 60 362, *Fusarium culmorum* ATCC 62 214, *Fusarium culmorum* ATCC 62 215 eller *Fusarium culmorum* ATCC 60 075 eller en mutant eller en variant deraf.

5

I sin mest foretrukne udførelsesform tilvejebringer opfindelsen et lipolytisk enzym afledt ud fra stammen *Fusarium culmorum* CBS 513.94 eller en mutant eller en variant deraf. Denne stamme er blevet deponeret ifølge Budapesttraktaten vedrørende International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure ved Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS), Oesterstraat 1, Postbus 273, NL-3740 AG Baarn, Holland, den 25. oktober 1994.

10

I et andet aspekt tilvejebringer opfindelsen en biologisk ren kultur af stammen *Fusarium culmorum* CBS 513.94.

15

Fysisk-kemiske egenskaber

I foretrukne udførelsesformer kan de lipolytiske enzymer ifølge opfindelsen karakteriseres ved at have én eller flere af følgende fysisk-kemiske egenskaber.

20

Enzymet har et pH-optimum i området fra ca. 7 til ca. pH 9, mere specifikt ca. pH 8, når det bestemmes ved 30 °C med tributyrin som substrat.

25

Enzymet har følgende N-terminalaminosyresekvens (jf. SEQ ID NO:1):

Ala-Val-Ser-Val-Ser-Thr-Thr-Asp-Phe-Gly-Asn-Phe-Lys-Phe-Tyr-Ile-Gln-His-Gly-Ala-Ala-Ala-Tyr-Xaa-Asn.

30

Enzymet har en molekylvægt på 28,4 kDa som bestemt ved massepektrometri.

Fremstilling af det lipolytiske enzym

35

Det lipolytiske enzym ifølge opfindelsen kan fremstilles ved dyrkning af en stamme af *Fusarium culmorum* i et egnet næringsmedium, der indeholder

carbon- og nitrogenkilder og uorganiske salte, efterfulgt af indvinding af lipasen. I en foretrukken udførelsesform er den lipaseproducerende stamme *Fusarium culmorum* CBS 513.94 eller en mutant eller en variant deraf.

5 Det lipolytiske enzym kan også opnås ved rekombinant DNA-teknologi ved fremgangsmåder kendt inden for faget *per se*, for eksempel ved at isolere et DNA-fragment, der indkoder lipasen, kombinere DNA-fragmentet med passende ekspres-sionssignal(er) i en passende vektor, introducere vektoren eller dele deraf i en passende vært enten som et autonomt replikerende plasmid eller integreret i kromosomet, dyrke værtsorganismen under betingelser, der fører til ekspresion af lipasen og indvinde lipasen ud fra dyrkningsmediet.

15 I foretrukne udførelsesformer af opfindelsen er værtsorganismen af bakteriel oprindelse, fortrinsvis en stamme af *Escherichia coli* eller en stamme af *Bacillus* eller en stamme af *Streptomyces*, eller af svampeoprindelse, fortrinsvis en stamme af *Aspergillus*, en stamme af *Neurospora*, en stamme af *Fusarium* eller en stamme af *Trichoderma*, eller en gær-celle, fortrinsvis en stamme af *Saccharomyces* eller en stamme af *Kluyveromyces* eller en stamme af *Hansenula* eller en stamme af *Pichia*.

Efter dyrkningen kan det lipolytiske enzym indvindes og oprenses ud fra dyrkningsnæringsvæsken ved traditionelle fremgangsmåder, såsom hydrofob kromatografi, ionbytningskromatografi eller kombinationer deraf.

25

Lipolytisk aktivitet

Den lipolytiske aktivitet kan bestemmes under anvendelse af tributyrin som substrat. Denne fremgangsmåde er baseret på enzymets hydrolyse af tributyrin, og alkaliforbruget registreres som en funktion af tiden.

30

En lipaseenhed (LU) er defineret som den enzymmængde, der under standardbetingelser (dvs. ved 30,0 °C; pH 7,0; og tributyrin som substrat) frigiver 1 µmol titrerbar smørsyre pr. min. Gummi arabicum anvendes som emulgerings-middel.

35

En folder, AF 95/5, der beskriver denne analytiske fremgangsmåde mere detaljeret, er tilgængelig ved forespørgsel hos Novo Nordisk A/S, Danmark, hvilken folder herved er indbefattet under henvisning.

5 Detergensammensætninger

Det lipolytiske enzym ifølge opfindelsen kan typisk være en bestanddel af en detergensammensætning. Det kan som sådan indbefattes i
10 detergensammen-sætningen i form af et ikke-støvende granulat, en stabiliseret væske eller et beskyttet enzym. Ikke-støvende granulater kan for eksempel fremstilles som beskrevet i US 4 106 991 og 4 661 452 (begge til Novo Industri A/S) og kan eventuelt coates ved fremgangsmåder kendt inden for faget. Eksempler på voksagtige coatingmaterialer er
15 poly(ethylenoxid)produkter (polyethylenglycol, PEG) med middelmolekylvægte på fra 1000 til 20 000; ethoxylerede nonylphenoler, der har fra 16 til 50 ethylenoxidenheder; ethoxylerede fedtalkoholer, i hvilke alkoholen indeholder fra 12 til 20 carbonatomer, og i hvilke der er fra 15 til 80 ethylenoxidenheder; fedtalkoholer; fedtsyrer; og mono- og di- og triglycerider af fedtsyrer. Eksempler på filmdannende coatingmaterialer egnede til anvendelse ved
20 teknikker med fluidt leje er givet i patent GB 1 483 591. Væskeformige enzympræparater kan for eksempel stabiliseres ved at tilsætte en polyol, såsom propylenglycol, en sukkerart eller en sukkeralkohol, mælkesyre eller borsyre ifølge de etablerede fremgangsmåder. Andre enzymstabiliserende midler er velkendte inden for faget. Beskyttede enzymer kan fremstilles ifølge
25 fremgangsmåden beskrevet i EP 238 216.

Detergensammensætningen ifølge opfindelsen kan være i en hvilken som helst bekvem form, for eksempel som pulver, granuler, pasta eller væske. Et væskeformigt detergent kan være vandholdigt, hvor det typisk indeholder op til
30 70 % vand og 0-30 % organisk opløsningsmiddel, eller ikke-vandholdigt.

Detergensammensætningen omfatter ét eller flere overfladeaktive midler, som hver for sig kan være anioniske, nonioniske, kationiske eller zwitterioniske. Detergentet indeholder sædvanligvis 0-50 % anionisk overfladeaktivt middel,
35 såsom lineær alkylbensulfonat (LAS), alfa-olefinsulfonat (AOS), alkylsulfat (fedtalkohol-sulfat) (AS), alkoholethoxysulfat (AEOS eller AES), sekundære alkansulfonater (SAS), alfa-sulfofedtsyremethylestere, alkyl- eller

alkenylravsyre, eller sæbe. Den kan også indeholde 0-40 % nonionisk overfladeaktivt middel, såsom alkoholethoxylat (AEO eller AE), carboxylerede alkoholethoxylater, nonylphenoethoxylat, alkylpolyglycosid, alkyl-dimethylaminoxid, ethoxyleret fedtsyremonoethanolamid, fedtsyremonoethanolamid eller polyhydroxyalkylfedtsyreamid (for eksempel som beskrevet i WO 92/06 154).

Detergentsammensætningen kan endvidere omfatte ét eller flere andre enzymer, som traditionelt anvendes i detergentsammensætninger, såsom en amylase, en cutinase, en protease, en cellulase, en peroxidase og/eller en oxidase.

Detergentet kan indeholde 1-65 % af en detergentbuilder eller et kompleksdannende middel, såsom zeolit, diphosphat, triphosphat, fosphonat, citrat, nitrolo-trieddikesyre (NTA), ethylendiamintetraeddikesyre (EDTA), diethylentriaminpenta-eddikesyre (DTMPA), alkyl- eller alkenylravsyre, opløselige silicater eller lagdelte silicater (for eksempel SKS-6 fra Hoechst). Detergentet kan også være ikke-builderholdigt, dvs. i alt væsentligt fri for detergentbuilder.

Detergentet kan omfatte én eller flere polymerer. Eksempler er carboxymethylcellulose (CMC), poly(vinylpyrrolidon) (PVP), polyethylenglycol (PEG), poly-(vinylalkohol) (PVA), polycarboxylater såsom polyacrylater, malein/acylsyre-copolymerer og laurylmethactylat/acrylsyre-copolymerer.

Detergentet kan indeholde et blegemiddelsystem, der kan omfatte en H_2O_2 -kilde, såsom perborat eller percarbonat, som kan kombineres med en persyre-dannende blegemiddelaktivator, såsom tetraacetylethylendiamin (TAED) eller nonanoyloxybenzensulfonat (NOBS). Blegemiddelsystemet kan alternativt omfatte peroxysyrer af for eksempel amid-, imid eller sulfontypen.

Enzymerne i detergentsammensætningen ifølge opfindelsen kan stabiliseres under anvendelse af stabiliseringsmidler, for eksempel en polyol, såsom propylen-glycol eller glycerol, en sukkerart eller en sukkeralkohol, mælkesyre, borsyre eller et borsyrederivat såsom for eksempel en aromatisk boratester, og sammensætningen kan formuleres som beskrevet i for eksempel WO 92/19 709 og WO 92/19 708.

5 Detergentet kan også indeholde andre traditionelle detergentbestanddele, såsom for eksempel stofkonditioneringsmidler, der indbefatter lerarter, skumforstærkere, sæbeskumsundertrykkende midler, antikorrosionsmidler, smuds-suspenderende midler, antimudsgenaflejningsmidler, farvestoffer, baktericider, optisk hvidt eller parfume.

pH'en (målt i vandig opløsning ved brugskoncentration) vil sædvanligvis være neutral eller alkalisk, for eksempel i området 7-11.

10 Særlige former af detergentsammensætninger inden for omfanget af opfindelsen indbefatter:

1) En detergentsammensætning formuleret som et granulat, der har en bulkmassefylde på mindst 600 g/l, som omfatter

Lineær alkylbenzensulfonat (beregnet som syre)	7 – 12 %
Alkoholethoxysulfat (for eksempel C ₁₂₋₁₈ -alkohol, 1-2 EO) eller alkylsulfat (for eksempel C ₁₀₋₁₈)	1 – 4 %
Alkoholethoxylat (for eksempel C ₁₄₋₁₅ -alkohol, 7 EO)	5 – 9 %
Natriumcarbonat (som Na ₂ CO ₃)	14 – 20 %
Opløseligt silicat (som Na ₂ O,2SiO ₂)	2 – 6 %
Zeolit (som NaA1SiO ₄)	15 – 22 %
Natriumsulfat (som Na ₂ SO ₄)	0 – 6 %
Natriumcitrat/citronsyre (som C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ /C ₆ H ₈ O ₇)	0 – 15 %
Natriumperborat (som NaBO ₃ ·H ₂ O)	11 – 18 %
TAED	2 – 6 %
Carboxymethylcellulose	0 – 2 %
Polymerer (for eksempel malein/acrylsyre-copolymer, PVP, PEG)	0 – 3 %
Enzymer (beregnet som rent enzymprotein)	0,0001 – 0,1 %
Mindre bestanddele (for eksempel sæbeskumsundertrykkende midler, parfume, optisk hvidt, lysblegemidler)	0 – 5 %

15

2) En detergentsammensætning formuleret som et granulat, der har en bulkmassefylde på mindst 600 g/l, som omfatter

Lineær alkylbenzensulfonat (beregnet som syre)	6 - 11 %
Alkoholethoxysulfat (for eksempel C ₁₂₋₁₈ -alkohol, 1-2 EO eller alkylsulfonat (for eksempel C ₁₈₋₁₈))	1 - 3 %
Alkoholethoxylat (for eksempel C ₁₄₋₁₅ -alkohol, 7 EO)	5 - 9 %
Natriumcarbonat (som Na ₂ CO ₃)	15 - 21 %
Opløseligt silicat (som Na ₂ O,2SiO ₂)	1 - 4 %
Zeolit (som NaA1SiO ₄)	24 - 34 %
Natriumsulfat (som Na ₂ SO ₄)	4 - 10 %
Natriumcitra/citronsyre (som C ₆ H ₆ Na ₃ O ₇ /C ₆ H ₈ O ₇)	0 - 15 %
Carboxymethylcellulose	0 - 2 %
Polymerer (for eksempel malein/acrylsyre-copolymer, PVP, PEG)	1 - 6 %
Enzymer (beregnet som rent enzymprotein)	0,0001 - 0,1 %
Mindre bestanddele (for eksempel sæbeskumsundertrykkende midler, parfume)	0 - 5 %

3) En detergentsammensætning formuleret som et granulat, der har en bulkmassefylde på mindst 600 g/l, som omfatter

5

Lineær alkylbenzensulfonat (beregnet som syre)	5 - 9 %
Alkoholethoxylat (for eksempel C ₁₂₋₁₅ -alkohol, 7 EO)	7 - 14 %
Sæbe som fedtsyre (for eksempel C ₁₈₋₂₂ -fedtsyre)	1 - 3 %
Natriumcarbonat (som Na ₂ CO ₃)	10 - 17 %
Opløseligt silicat (som Na ₂ O,2SiO ₂)	3 - 9 %
Zeolit (som NaA1SiO ₄)	23 - 33 %
Natriumsulfat (som Na ₂ SO ₄)	0 - 4 %
Natriumperborat (som NaBO ₃ ·H ₂ O)	8 - 16 %
TAED	2 - 8 %
Phosphonat (for eksempel EDTMPA)	0 - 1 %
Carboxymethylcellulose	0 - 2 %
Polymerer (for eksempel malein/acrylsyre-copolymer, PVP, PEG)	0 - 3 %
Enzymer (beregnet som rent enzymprotein)	0,0001 - 0,1 %
Mindre bestanddele (for eksempel sæbeskumsundertrykkende midler, parfume, optisk hvidt)	0 - 5 %

4) En detergentsammensætning formuleret som et granulat, der har en bulkmassefylde på mindst 600 g/l, som omfatter

Lineær alkylbenzensulfonat (beregnet som syre)	8 – 12 %
Alkoholethoxylat (for eksempel C ₁₂₋₁₅ -alkohol, 7 EO)	10 – 25 %
Natriumcarbonat (som Na ₂ CO ₃)	14 – 22 %
Opløseligt silicat (som Na ₂ O,2SiO ₂)	1 – 5 %
Zeolit (som NaAlSiO ₄)	25 – 35 %
Natriumsulfat (som Na ₂ SO ₄)	0 – 10 %
Carboxymethylcellulose	0 – 2 %
Polymerer (for eksempel malein/acrylsyre-copolymer, PVP, PEG)	1 – 3 %
Enzymer (beregnet som rent enzymprotein)	0,0001 – 0,1 %
Mindre bestanddele (for eksempel sæbeskumsundertrykkende midler, parfume)	0 – 5 %

5) En vandig væskeformig detergentsammensætning, som omfatter

Lineær alkylbenzensulfonat (beregnet som syre)	15 – 21 %
Alkoholethoxylat (for eksempel C ₁₂₋₁₅ -alkohol, 7 EO eller C ₁₂₋₁₅ -alkohol, 5 EO)	12 – 18 %
Sæbe som fedtsyre (for eksempel oleinsyre)	3 – 13 %
Alkenylravsyre (C ₁₂₋₁₄)	0 – 13 %
Aminoethanol	8 – 18 %
Citronsyre	2 – 8 %
Phosphonat	0 – 3 %
Polymerer (for eksempel PVP, PEG)	0 – 3 %
Borat (som B ₄ O ₇)	0 – 2 %
Ethanol	0 – 3 %
Propylenglycol	8 – 14 %
Enzymer (beregnet som rent enzymprotein)	0,0001 – 0,1 %
Mindre bestanddele (for eksempel dispergeringsmidler, sæbeskumsundertrykkende midler, parfume, optisk hvidt)	0 – 5 %

6) En vandig struktureret væskeformig detergentsammensætning, som omfatter

Lineær alkylbenzensulfonat (beregnet som syre)	15 – 21 %
Alkoholethoxylat (for eksempel C ₁₂₋₁₅ -alkohol, 7 EO eller C ₁₂₋₁₅ -alkohol, 5 EO)	3 – 9 %
Sæbe som fedtsyre (for eksempel oleinsyre)	3 – 10 %
Zeolit (som NaAlSiO ₄)	14 – 22 %
Kaliumcitrat	9 – 18 %
Borat (som B ₄ O ₇)	0 – 2 %
Carboxymethylcellulose	0 – 2 %
Polymerer (for eksempel PEG, PVP)	0 – 3 %
Forankringspolymerer, såsom for eksempel laurylmethacrylat/acrylsyre-copolymer, molært forhold 25:1; MV 3800	0 – 3 %
Glycerol	0 – 5 %
Enzymer (beregnet som rent enzymprotein)	0,0001 – 0,1 %
Mindre bestanddele (for eksempel dispergeringsmidler, sæbeskumsundertrykkende midler, parfume, optisk hvidt)	0 – 5 %

5

7) En detergentsammensætning formuleret som et granulat, der har en bulkmassefylde på mindst 600 g/l, som omfatter

Fedtalkoholsulfat	5 – 10 %
Ethoxileret fedtsyremonoethanolamid	3 – 9 %
Sæbe som fedtsyre	0 – 3 %
Natriumcarbonat (som Na ₂ CO ₃)	5 – 10 %
Opløseligt silicat (som Na ₂ O,2SiO ₂)	1 – 4 %
Zeolit (som NaAlSiO ₄)	20 – 40 %
Natriumsulfat (som Na ₂ SO ₄)	2 – 8 %
Natriumperborat (som NaBO ₃ ·H ₂ O)	12 – 18 %
TAED	2 – 7 %
Polymerer (for eksempel malein/acrylsyre-copolymer, PEG)	1 – 5 %
Enzymer (beregnet som rent enzymprotein)	0,0001 – 0,1 %
Mindre bestanddele (for eksempel optisk hvidt, sæbeskumsundertrykkende midler, parfume)	0 – 5 %

8) En detergentsammensætning formuleret som et granulat, der omfatter

Lineær alkylbenzensulfonat (beregnet som syre)	8 – 14 %
Ethoxyleret fedtsyremonoethanolamid	5 – 11 %
Sæbe som fedtsyre	0 – 3 %
Natriumcarbonat (som Na_2CO_3)	4 – 10 %
Opløseligt silicat (som $\text{Na}_2\text{O}, 2\text{SiO}_2$)	1 – 4 %
Zeolit (som NaAlSiO_4)	30 – 50 %
Natriumsulfat (som Na_2SO_4)	3 – 11 %
Natriumcitrat (som $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$)	5 – 12 %
Polymerer (for eksempel PVP, malein/acrylsyre-copolymer, PEG)	1 – 5 %
Enzymer (beregnet som rent enzymprotein)	0,0001 – 0,1 %
Mindre bestanddele (for eksempel sæbeskumsundertrykkende midler, parfume)	0 – 5 %

9) En detergentsammensætning formuleret som et granulat, der omfatter

Lineær alkylbenzensulfonat (beregnet som syre)	6 – 12 %
Nonionisk overfladeaktivt middel	1 – 4 %
Sæbe som fedtsyre	2 – 6 %
Natriumcarbonat (som Na_2CO_3)	14 – 22 %
Zeolit (som NaAlSiO_4)	18 – 32 %
Natriumsulfat (som Na_2SO_4)	5 – 20 %
Natriumcitrat (som $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$)	3 – 8 %
Natriumperborat (som $\text{NaBO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	4 – 9 %
Blegemiddelaktivator (for eksempel NOBS eller TAED)	1 – 5 %
Carboxymethylcellulose	0 – 2 %
Polymerer (for eksempel polycarboxylat eller PEG)	1 – 5 %
Enzymer (beregnet som rent enzymprotein)	0,0001 – 0,1 %
Mindre bestanddele (for eksempel optisk hvidt, parfume)	0 – 5 %

10) En vandig væskeformig detergentsammensætning, der omfatter

Lineær alkylbenzensulfonat (beregnet som syre)	15 – 23 %
Alkoholethoxysulfat (for eksempel C ₁₂₋₁₅ -alkohol, 2-3 EO)	8 – 15 %
Alkoholethoxylat (for eksempel C ₁₂₋₁₅ -alkohol, 7 EO eller C ₁₂₋₁₅ -alkohol, 5 EO)	3 – 9 %
Sæbe som fedtsyre (for eksempel laurinsyre)	0 – 3 %
Aminoethanol	1 – 5 %
Natriumcitrat	5 – 10 %
Hydrotrop (for eksempel natriumtoluensulfonat)	2 – 6 %
Borat (som B ₄ O ₇)	0 – 2 %
Carboxymethylcellulose	0 – 1 %
Ethanol	1 – 3 %
Propylenglycol	2 – 5 %
Enzymer (beregnet som rent enzymprotein)	0,0001 – 0,1 %
Mindre bestanddele (for eksempel polymerer, dispergeringsmidler, parfume, optisk hvidt)	0 – 5 %

11) En vandig væskeformig detergentsammensætning, der omfatter

Lineær alkylbenzensulfonat (beregnet som syre)	20 – 32 %
Alkoholethoxylat (for eksempel C ₁₂₋₁₅ -alkohol, 7 EO eller C ₁₂₋₁₅ -alkohol, 5 EO)	6 – 12 %
Aminoethanol	2 – 6 %
Citronsyre	8 – 14 %
Borat (som B ₄ O ₇)	1 – 3 %
Polymer (for eksempel malein/acrylsyre-copolymer, forankringspolymer, såsom for eksempel laurylmethacrylat/acrylsyre-copolymer)	0 – 3 %
Glycerol	3 – 8 %
Enzymer (beregnet som rent enzymprotein)	0,0001 – 0,1 %
Mindre bestanddele (for eksempel hydrotropmidler, dispergeringsmidler, parfume, optisk hvidt)	0 – 5 %

12) En detergentsammensætning formuleret som et granulat, der har en bulkmassefyldte på mindst 600 g/l, som omfatter

Anionisk overfladeaktivt middel (lineær alkylbensulfonat, alkylsulfonat, alfa-olefinsulfonat, alfa-sulfofedsyremethylestere, alkan-sulfonater, sæbe)	25 - 40 %
Nonionisk overfladeaktivt middel (for eksempel alkoholethoxylat)	1 - 10 %
Natriumcarbonat (som Na ₂ CO ₃)	8 - 25 %
Opløselige silicater (som Na ₂ O,2SiO ₂)	5 - 15 %
Natriumsulfat (som Na ₂ SO ₄)	0 - 5 %
Zeolit (som NaA1SiO ₄)	15 - 28 %
Natriumperborat (som NaBO ₃ .4H ₂ O)	0 - 20 %
Blegemiddelaktivator (TAED eller NOBS)	0 - 5 %
Enzymer (beregnet som rent enzymprotein)	0,0001 - 0,1 %
Mindre bestanddele (for eksempel parfume, optisk hvidt)	0 - 3 %

5

13) Detergentformuleringer som beskrevet i 1) - 12), hvor alt eller en del af det lineære alkylbensulfonat er erstattet med (C₁₂-C₁₈)alkylsulfat.

14) En detergentsammensætning formuleret som et granulat, der har en bulkmassefyldte på mindst 600 g/l, som omfatter

(C ₁₂ -C ₁₈)-alkylsulfat	9 - 15 %
Alkoholethoxylat	3 - 6 %
Polyhydroxyalkylfedsyreamid	1 - 5 %
Zeolit (som NaA1SiO ₄)	10 - 20 %
Lagdelt disilicat (for eksempel SK56 fra Hoechst)	10 - 20 %
Natriumcarbonat (som Na ₂ CO ₃)	3 - 12 %
Opløseligt silicat (som Na ₂ O,2SiO ₂)	0 - 6 %
Natriumcitrat	4 - 8 %
Natriumpercarbonat	13 - 22 %
TAED	3 - 8 %
Polymerer (for eksempel polycarboxylater og PVP)	0 - 5 %
Enzymer (beregnet som rent enzymprotein)	0,0001 - 0,1 %
Mindre bestanddele (for eksempel optisk hvidt, lysblegemiddel, parfume, sæbeskumsundertrykkende midler)	0 - 5 %

15) En detergentsammensætning formuleret som et granulat, der har en bulkmassefylde på mindst 600 g/l, som omfatter

(C ₁₂ -C ₁₈)-alkylsulfat	4 - 8 %
Alkoholethoxylat	11 - 15 %
Sæbe	1 - 4 %
Zeolit MAP eller zeolit A	35 - 45 %
Natriumcarbonat (som Na ₂ CO ₃)	2 - 8 %
Opløseligt silicat (som Na ₂ O,2SiO ₂)	0 - 4 %
Natriumpercarbonat	13 - 22 %
TAED	1 - 8 %
Carboxymethylcellulose	0 - 3 %
Polymerer (for eksempel polycarboxylater og PVP)	0 - 3 %
Enzymer (beregnet som rent enzymprotein)	0,0001 - 0,1 %
Mindre bestanddele (for eksempel optisk hvidt, fosfonat, parfume)	0 - 5 %

5 16) Detergentformuleringer som beskrevet i 1) - 15), der indeholder en stabiliseret eller indkapslet persyre, enten som en yderligere bestanddel eller som en substitut for allerede specificerede blegemiddelsystemer.

10 17) Detergentsammensætninger som beskrevet i 1), 3), 7), 9) og 12), hvor perboratet er erstattet af percarbonat.

15 18) Detergentsammensætninger som beskrevet i 1), 3), 7), 9), 12), 14) og 15), som yderligere indeholder en mangankatalysator. Mangankatalysatoren kan for eksempel være én af forbindelserne beskrevet i "Efficient manganese catalysts for low-temperature bleaching", Nature 369, 1994, siderne 637-639.

20 19) Detergentsammensætning formuleret som en ikke-vandig detergentvæske, der omfatter et væskeformigt nonionisk overfladeaktivt middel, såsom for eksempel en lineær alkoxyleret primær alkohol, et buildersystem (for eksempel fosfat), et enzym og alkali. Detergentet kan også omfatte et anionisk overfladeaktivt middel og/eller et blegemiddelsystem.

Det lipolytiske enzym ifølge opfindelsen kan inkorporeres i koncentrationer, der traditionelt anvendes i detergenter. Det påtænkes for øjeblikket, at lipasen i

detergentsammensætningen ifølge opfindelsen kan tilsættes i en mængde, der svarer til 0,001-100 mg lipase pr. liter vaskevæske.

EKSEMPLER

- 5 Opfindelsen illustreres yderligere med henvisning til de efterfølgende eksempler, som ikke tilsigter af være begrænsende på nogen som helst måde for omfanget af opfindelsen ifølge kravene.

EKSEMPEL 1

10

Dyrkningseksempel

Der blev fremstillet podekulturer af stammen *Fusarium culmorum* CBS 513.94 i 500 ml rystekolber, der indeholdt 100 ml, med følgende sammensætning:

Majsstøbevæske (tørret)	12 g/l
Glucose	24 g/l

15

Til hver kolbe tilsættes 0,5 g CaCO₃ og 0,5 ml olie. pH indstilles på 5,5 før autoklaving.

20

Efter 3 dage ved 26 °C og 250 omdr. pr. min. blev 5 ml af hver af podekulturene podet i rysteflasker, der indeholdt 100 ml af følgende medium:

Pepton, Difco 0118	6 g/l
Pepticase, Sheffield Products	4 g/l
Gærekstrakt, Difco 0127	3 g/l
Kødekstrakt, Difco 0126	1,5 g/l
Dextrose, Roquette 101-0441	1 g/l
Olivenolie, Sigma	10 g/l

pH indstilles på 7,3-7,4 før autoklaving.

25

Dyrkningen foregik i 9 dage ved 26 °C og 250 omdr. pr. min. Næringsvæskerne blev centrifugeret, og supernatanterne blev oprenset på en hydrofob matrix (TSK gel ButylToyoPearl 650 C-søjle tilgængelig fra Tosoh Corporation, Japan) og anvendt til yderligere undersøgelser.

Eksempel 2Karakteriseringseksempel5 pH-optimum

Den ifølge eksempel 1 opnåede supernatant blev underkastet LU-metoden til bestemmelse af den ovenfor beskrevne lipaseaktivitet, og relationen mellem pH og lipaseaktiviteten af de lipolytiske enzymer ifølge opfindelsen blev
10 bestemt ved 30 °C i området fra pH 6 til pH 10.

Resultaterne af denne karakterisering er præsenteret i fig. 1. Det lipolytiske enzym har sit pH-optimum i området fra ca. pH 7 til ca. pH 9, mere specifikt ca. pH 8.
15

Molekylvægtbestemmelse

Det blev udført massespektrometri under anvendelse af matrixunderstøttet laser desorption ionisation time-of flight (MALDI-TOF)-massespektrometri med et VG Analytical ToFSpec. Til massespektrometri blev 2 µl prøve opnået ifølge
20 eksempel 1 blandet med 2 µl mættet matrixopløsning (α-cyano-4-hydroxykanelsyre i 0,1 % TFA:acetonitril (70:30)), og 2 µl af blandingen blev som en plet anbragt på målpladen. Før introduktion i massespektrometret blev opløsningsmidlet fjernet ved afdampning. Prøven blev desorberet og ioniseret
25 med 4 ns laserpulse (337 nm) ved tærskellasereffekt og-accelereret ind i det feltfrie banerør med en accelererende spænding på 25 kV. Ioner blev påvist med en mikrokanalplade indstillet på 1850 V. Spektrene blev kalibreret eksternt med proteiner med kendt masse.

30 Der blev bestemt en masse på 28,4 kDa.

N-terminalaminosyresekvens

Under anvendelse af standardmetoder til opnåelse og sekvensbestemmelse af
35 peptider [Findlay & Geisow (red.) (1989); Protein sequencing – a practical approach; IRL Press] er følgende 25-N-terminalaminosyreester af det

lipolytiske enzym blevet identificeret som præsenteret ved SEQ ID NO:1 (hvor Xaa betegner en ukendt aminosyrerest):

5 Ala-Val-Ser-Val-Ser-Thr-Thr-Asp-Phe-Gly-Asn-Phe-Lys-Phe-Tyr-Ile-Gln-His-
Gly-Ala-Ala-Ala-Tyr-Xaa-Asn.

EKSEMPEL 3

Lipolytisk aktivitet

10

Under anvendelse af et monolagsudstyr (KSV-500, KSV Instruments, Finland) er det blevet demonstreret, at det lipolytiske enzym fra *Fusarium culmorum* har betragtelig forøget aktivitet over for dicaprin i nærvær af langkædede alkoholethoxylater.

15

Et blandet monolag i en veldefineret samlet sammensætning fremstillet af et diglyceridsubstrat og en alkoholethoxylatmonobestanddel (AEO: Heptaethylenglycol-monooctadecylether) udsprede på en vandig subfase (10 mM Glycin, pH 10,0, 0,1 mM EDTA, 25 °C). Overfladetrykket indstilles på den ønskede værdi, og en veldefineret mængde enzym (10 LU; lipaseenhed som defineret ovenfor) sprøjtes ind i subfasen. Lipolytisk virkning manifesterer sig ved den hastighed af en mobil barriere, der komprimerer monolaget med henblik på at opretholde konstant overfladetryk, efterhånden som uopløselige substratmolekyler hydrolyseres til mere vandopløselige reaktionsprodukter. Under anvendelse af dette assay bedømmes lipolytiske enzymer ved en parameter β , der angiver den areal-slutbrøkdelen af substrat (dicaprin), der forbliver ikke-hydrolyseret af enzymet, når den lipolytiske aktivitet standser.

20

25

På denne måde blev lipasen ifølge opfindelsen sammenlignet med en *Aspergillus*-lipase, der traditionelt anvendes i detergenter (Lipolase™, tilgængelig fra Novo Nordisk A/S, Danmark). Resultaterne er præsenteret i tabel 1 nedenfor.

Tabel 1

Forbedret tolerance af lipolytisk enzym fra *Fusarium culmorum* sammen-lignet med Lipolase™.

5

	β (30 mN/m) *
Lipolase™	57 %
<i>Fusarium culmorum</i> lipase	25 %

* Anvendt overfladetryk

10

Disse resultater viser, at ved sammenligning med Lipolase™ er det lipolytiske enzym opnået ud fra *Fusarium culmorum* betragteligt mere virkningsfuldt, når der er alkoholethoxylater til stede i substratfasen.

EKSEMPEL 4Substrataffinitet

15

Der er blevet udviklet en fremgangsmåde, som sigter mod en enkel sammenligning af lipolytiske enzyms evne til akkumulere på/i en substratfase (olivenolie) ved alkalisk pH (pH 9,0) og tilstedeværelse af det nonioniske overflade-aktive middel Dobanol 25-7 (2500 ppm) i den vandige fase.

20

Procedure

1. To identiske pufferopløsninger (5 ml) fremstilles i 20 ml hætteglas, der kan forsegles, ("prøve" (s) og "reference" (r)).
2. Det tilsættes enzym til "prøve" og "reference", og lipasekoncentrationen bestemmes (X LU/ml).
3. Det tilsættes olivenolie til "prøve" og begge lipaseopløsninger rystes kraftigt. Inkubation ved 4 °C natten over.
4. Tilbageværende lipasekoncentration i de vandige faser bestemmes efter inkubation (Y, LU/ml; i=r,s).

30

Sammendrag af inkubationsbetingelser

Puffer	100 mM glycin (5 ml)
pH	9,0
Substrat	Olivenolie (5 ml).
Temperatur	4 °C
Lipaseaktivitet	5-10 LU/ml
Inkubation	Natten over (24-26 h)

Evaluering af data

- 5 Resultatet beregnes ved at sammenligne aktivitetstabet ved inkubering i den vandige fase i kontakt med olivenolien med aktivitetstabet i den vandige fase i fravær af olivenolie:

$$\alpha = Y_p/Y_r \text{ (se ovenfor)}$$

10

Resultaterne er præsenteret i tabel 2 nedenfor.

Tabel 2

15

Substrataffinitet

Lipolytisk enzym	α (%)
Lipolase™	99 %
<i>Fusarium culmorum</i> lipase	99 %

SEKVENSLISTE

(2) INFORMATION OM SEQ ID NO: 1:

- (i) SEKVENSEGENS KABER:
- (A) LÆNGDE: 25 aminosyrer
- (B) TYPE: aminosyre
- (C) BESKAFFENHED: enkel
- (D) TOPOLOGI: lineær
- (ii) MOLEKYLTYP E: peptid
- (v) FRAGMENTTYPE: N-terminal
- (vi) NATURLIG OPRINDELSE:
- (A) ORGANISME: *Fusarium culmorum*
- (B) STAMME: CBS 513.94
- (ix) EGENSKABER:
- (A) NAVN/KODE: CDS
- (B) PLACERING: 101..1433
- (ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 1:
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Val | Ser | Val | Ser | Thr | Thr | Asp | Phe | Gly | Asn | Phe | Lys | Phe | Tyr | Ile |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Gln | His | Gly | Ala | Ala | Ala | Tyr | Xaa | Asn | | | | | | | |
| | | | | 20 | | | | 25 | | | | | | | |

TILKENDEGIVELSER VEDRØRENDE EN DEPONERET MIKRO-ORGANISME

(PCT-regel 13bis)

A. De nedenfor anførte tilkendegivelser angår den mikroorganisme, der er henvist til i beskrivelsen på side 3, linieme 9-14	
B. IDENTIFIKATION AF OPBEVARINGSSTED	
Navn på depositarinstitution CENTRAALBUREAU VOOR SCHIMMELCULTURES	
Adresse på depositarinstitution Oosterstraat 1, Postbus 273, NL-3740 AG BARN 1, Holland	
Deponeringsdato: 25. oktober 1994	Accessionsnummer CBS 513.94
C. YDERLIGERE TILKENDEGIVELSER	
Med hensyn til de designationer, hvormed et europæisk og/eller et australsk patent søges, medens patentansøgningen verserer, stilles en prøve af den deponerede mikroorganisme kun til rådighed for en uafhængig ekspert nomineret af den person, der efterspørger prøven (Regel 28 (4) EPC / Forordning 3.25 ifølge Australia Statutory Rules 1991 No 71).	

Patentkrav

1. Lipolytisk enzym, der
 - 5 a) er afledt ud fra en stamme af *Fusarium culmorum*,
 - b) har et pH-optimum i området fra ca. 7 til ca. pH 9, når det bestemmes ved 30 °C med tributyrin som substrat, og
 - 10 c) har følgende N-terminalaminosyresekvens:

Ala-Val-Ser-Val-Ser-Thr-Thr-Asp-Phe-Gly-Asn-Phe-Lys-Phe-Tyr-Ile-Gln-His-
Gly-Ala-Ala-Ala-Tyr-Xaa-Asn-
- 15 2. Lipolytisk enzym ifølge krav 1, der er afledt ud fra stammen *Fusarium culmorum* CBS 513.94.
3. Lipolytisk enzym ifølge krav 1 eller 2, der har en molekylvægt på 28,4 kDa ved massespektrometri.
- 20 4. Fremgangsmåde til fremstilling af et lipolytisk enzym ifølge et hvilket som helst af kravene 1-3, hvilken fremgangsmåde omfatter dyrkning af en lipaseproducerende stamme af *Fusarium culmorum* i et egnet næringsmedium, der indeholder carbon- og nitrogenkilder og andre uorganiske salte, efterfulgt af indvinding af det lipolytiske enzym.
- 25 5. Fremgangsmåde ifølge krav 4, hvorved den lipaseproducerende stamme er stammen *Fusarium culmorum* CBS 513.94.
- 30 6. Fremgangsmåde til fremstilling af et lipolytisk enzym ifølge et hvilket som helst af kravene 1-3, hvilken fremgangsmåde omfatter at isolere et DNA-fragment, der indkoder det lipolytiske enzym; kombinere DNA-fragmentet med et passende ekspressionssignal i en passende plasmidvektor; introducere plasmidvektoren i en passende vært enten som et autonomt replikerende plasmid eller integreret i kromosomet; dyrke værtsorganismen under
35 betingelser, der fører til ekspression af det lipolytiske enzym; og indvinde enzymet ud fra dyrkningsmediet.

- 5 7. Fremgangsmåde ifølge krav 6, hvorved værtsorganismen er af bakteriel oprindelse, fortrinsvis en stamme af *Escherichia coli* eller en stamme af *Bacillus* eller en stamme af *Streptomyces*, eller af svampeoprindelse, fortrinsvis en stamme af *Aspergillus*, en stamme af *Neurospora*, en stamme af *Fusarium* eller en stamme af *Trichoderma*, eller en gærcele, fortrinsvis en stamme af *Saccharomyces* eller en stamme af *Kluyveromyces* eller en stamme af *Hansenula* eller en stamme af *Pichia*.
- 10 8. Detergentsammensætning, der omfatter det lipolytiske enzym ifølge et hvilket som helst af kravene 1-3.
- 15 9. Detergentsammensætning ifølge krav 8, som yderligere omfatter én eller flere andre enzymer, navnlig proteaser, amylaser, cellulaser, oxidaser og/eller peroxidaser.
- 20 10. Detergentadditiv, der omfatter det lipolytiske enzym ifølge et hvilket som helst af kravene 1-3 tilvejebragt i form af et granulat, fortrinsvis et ikke-støvende granulat, en væske, navnlig en stabiliseret væske, en opslæmning eller et beskyttet enzym.
11. Biologisk ren kultur af stammen *Fusarium culmorum* CBS 513.94.

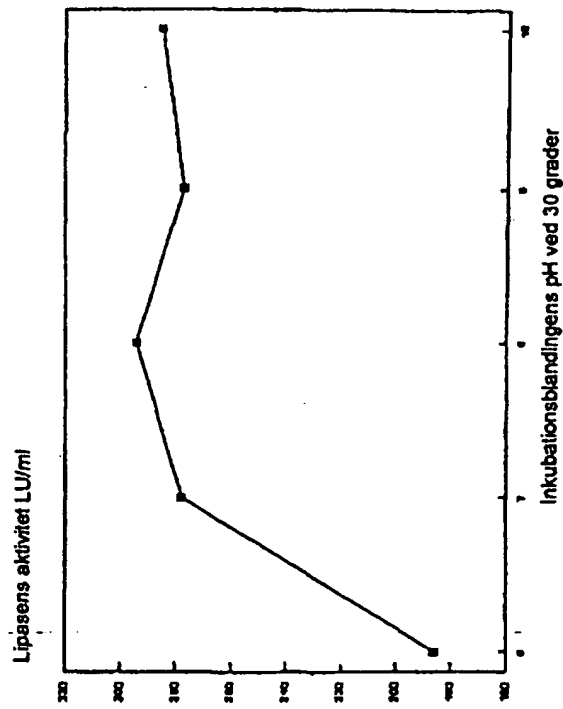


FIG. 1

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT OR DRAWING
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- GRAY SCALE DOCUMENTS
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.